

Aus dem Forschungslabor der Hautklinik
der Freien Universität Berlin, Rudolf-Virchow-Krankenhaus
Direktor: Professor Dr. G. Stüttgen

PENETRATION VON METHOTREXAT IN DIE MENSCHLICHE HAUT IN VITRO

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Maximilian Ottinger
aus Konstanz

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Forschungslabor der Hautklinik
der Freien Universität Berlin, Rudolf-Virchow-Krankenhaus
Direktor: Professor Dr. G. Stüttgen

PENETRATION VON METHOTREXAT IN DIE MENSCHLICHE HAUT IN VITRO

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von
Maximilian Ottinger
aus Konstanz

Referent : Professor Dr.rer.nat. H. Schaefer

Koreferent : Professor Dr.med. W. Schwarz

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Mai 1976



INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	Seite 1
MATERIAL und METHODIK	8
1 a) Verwendete Substanzen und Lösungen	8
1 b) Benötigte Reagenzien bei der Aufarbeitung der Haut	9
2) Haut	9
3) Beschreibung der Apparatur zur Messung des Penetrationsvorganges	10
4) Durchführung des Penetrationsvorganges	11
5) Aufarbeitung der Haut	12
6) Aktivitätsmessung	13
7) Bilanzierung der Aktivität	13
8) UMRECHNUNG der HORN-SCHWARTZ-EINHEITEN	14
8.1) Bestimmung der Aktivität der Hornschicht in der aufgetragenen Substanz	14

8b) Bestimmung der Substanzmenge in $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ Gewebe	Seite 19
8c) Bestimmung der Konzentrationen in Mol/cm^3 und Molarität	23
ERGEBNISSE	25
Tabellen	31
DISKUSSION	41
ZUSAMMENFASSUNG	47
ABBILDUNGEN	
LITERATUR	

EINLEITUNG

Seit geraumer Zeit und mit Erfolg wird Amethopterin (Methotrexat^(R)), ein ausgeprägtes Zytostatikum, auch in der Therapie von proliferativen Hauterkrankungen, so z.B. der Psoriasis, eingesetzt.

Man ist sich hierbei sehr wohl der Tatsache bewusst, dass dieses Medikament als Folsäureantagonist, das heisst als Hemmer der Methylgruppen-Übertragung, grundlegend in die Synthese der Desoxyribonukleinsäure eingreift.

Wie bei allen derartigen Zytostatika so besteht auch bei Methotrexat die Gefahr, dass in mehreren Organen mit schneller Zellproliferation Schäden auf der Ebene der Zellteilung induziert werden können. Es liegt also stets der Verdacht nahe, dass es bei Verwendung dieser Substanzen in der Therapie zu Organschäden kommen könnte.

So haben eine Reihe von Autoren immer wieder darauf hingewiesen, dass eine länger andauernde Methotrexat-Therapie die Leberfunktion beeinträchtigt.(1,2).

Der Sinn einer Psoriasis-Therapie mit Methotrexat ist es, die Zellteilung zu verlangsamen, die bekanntlich bei den Basaliszellen der psoriatischen Haut bis auf das neunfache beschleunigt ist.

Demzufolge hat man sich bemüht den Applikationsmodus, sowie die Dosierung, den speziellen Gegebenheiten der Haut, das heisst dem Zyklus der sich in der Haut teilenden Zellen anzupassen.

So haben WEINSTEIN und FROST (3) vorgeschlagen, in jeweils wöchentlichen Abständen Methotrexat^(R) in drei Gaben (2,5 - 7,5 mg) und diese in einem Zeitabstand von zwölf Stunden zu verabreichen, sodass einmal wöchentlich ein Zeitbereich von 36 Stunden und damit ein Teilungszyklus der psoriatischen Zellen komplett erfasst wird. Nach ihren Berechnungen fallen wegen der erheblich langsameren Teilung normaler Basalzellen der Haut nur 8 % sich teilender Zellen in diesen Bereich.

Nun hat es andererseits nicht an Versuchen gefehlt, diese erwiesene therapeutische Effizienz von Methotrexat auch in Form einer Lokalbehandlung zu nutzen (6,7,8,9). Diese könnte vor allem dann, wenn die Psoriasis nicht die gesamte Körperoberfläche betrifft, von erheblichem Vorteil sein, vor allem was die Frage toxischer Nebenwirkungen anbetrifft. Die folgende Überlegung soll dies verdeutlichen.

Geht man davon aus, dass 10 mg Methotrexat i.V. eine therapeutisch wirksame Dosis darstellt und weiter, dass diese Menge sich im Körper gleichmässig verteilen könnte, so gelangte hiervon nur ein kleiner Anteil nämlich weniger als ein hundertstel in die Epidermis. Diese wiegt bei einem Körpergewicht von 75 kg etwa 200 g. Geht man in erster Näherung von einer Gleichverteilung des Medikamentes im Organismus aus, so sollten dementsprechend ca. 25 µg in die Epidermis gelangen. Vorausgesetzt dass der Wirkungsmechanismus von Methotrexat auf einer kompetitiven Hemmung der Dihydrofolsäurereduktase, das heisst auf einer direkten Verdrängung des natürlichen Substrates Fol-

säure beruht, sollte schon eine Konzentration von 25 μ g Methotrexat in der gesamten Epidermis für eine entsprechende Wirkung ausreichend sein. Diese Menge könnte für den Gesamtorganismus als völlig untoxisch angesehen werden, selbst dann, wenn sie von der Haut aus vollständig in das Blutsystem übergeht.

Neben einigen wenigen Autoren, die glauben eine lokale Wirksamkeit von Methotrexat bei Psoriasis nachgewiesen zu haben (7), berichten die meisten Untersucher, dass Methotrexat lokal wirkungslos sei (6,8,9).

COMAISH und JUHLIN (6) haben sich grundlegend mit dieser Frage auseinandergesetzt. Sie applizierten radiomarkiertes Methotrexat auf die menschliche Haut und bestimmten die Harnausscheidung, das heisst sie untersuchten die Permeation von Methotrexat durch die menschliche Haut.

Bei der Bewertung der Ergebnisse kommen sie zu dem Schluss, dass eine fehlende Permeation der Grund für eine mangelnde Effizienz von Methotrexat bei lokaler Applikation darstellen könnte.

Nun stellt, wie aus zahlreichen Untersuchungen bekannt ist, die Applikationsform, das heisst Art und Zusammensetzung von Salben, Crem, Lotionen und ähnlichem als Trägerstoffe für ein Medikament eine wesentliche Voraussetzung für die Grösse der Penetration dar.

Weitaus die meisten Diskrepanzen bezüglich der Wirksamkeit können eventuell auf solche Unterschiede in der Applikationsform bei den verschiedenen Autoren zurückgeführt werden.

Weiter muss überlegt werden, dass die Permeation, das heisst das Durchwandern der lebenden Haut, wenn sie etwa an einer Rate des Verschwindens von der Oberfläche bzw. an auftretenden Serumkonzentrationen oder an der Ausscheidungsrate im Harn gemessen wird, keinen direkten Schluss auf die Konzentrationen in den einzelnen Hautschichten zulässt.

Vielmehr müssen solche Konzentrationen in der Haut selbst bestimmt werden, wenn Vergleiche zwischen einer lokalen Applikation und einer systemischen Applikation auf rechnerischer Basis angestellt werden sollen.

Wenn man davon ausgeht, dass Methotrexat bei der Therapie von proliferativen Hauterkrankungen so z.B. der Psoriasis bei lokaler Applikation zumindest nicht die gleiche therapeutische Effektivität aufweist wie nach systemischer Applikation, so kann dies mehrere Ursachen haben:

- 1) Methotrexat durchdringt zwar in relevanten Mengen die Haut, die stationären Konzentrationen bleiben aber infolge einer hohen Permeationsgeschwindigkeit jeweils so niedrig, dass sich daraus keine therapeutische Effizienz einstellen kann.

- 2) Methotrexat ist als per se instabiles Medikament

so labil, dass so gut wie kein unzersetztes Medikament in die lebenden Lagen der Haut gelangt, obwohl ausreichende Mengen radioaktives Material in der Haut bzw. später im Serum oder im Harn nachgewiesen werden.

3) Methotrexat penetriert in ausreichender Konzentration in die lebenden Schichten der Haut, es bleibt aber dort unwirksam, weil seine Effizienz eine Metabolisierung in der Leber voraussetzt, erst ein oder mehrere Metaboliten stellen das gegen den psoriatischen Pathomechanismus wirksame Agens dar.

4) Es muss davon ausgegangen werden, dass die Haut kein wesentlicher Bildungsort für Folsäure ist. Es ist daher denkbar, dass bei der Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen dem kompetitiven Hemmer Methotrexat und dem eigentlichen Substrat Folsäure, die Folatkonzentration am Enzym immer noch hoch genug ist.

Quantitativ gesehen ist dann zwar ein Grossteil der vorhandenen Dihydrofolsäurereduktase lokal gehemmt, aber doch nicht in einem so ausreichendem Masse, dass der Gesamtmechanismus der Methylgruppen-Uebertragung relevant unterbunden würde. Dies hätte zur Konsequenz, dass nur dann ein entsprechender Mechanismus zu Tragen kommen kann, wenn (vielleicht nur für kurze Zeit) von der systemischen Synthese her die Zulieferung an Folat für die Haut unterbunden wird.

Diese Arbeitshypothese wird durch die Untersuchungen von COMAISH und JUHLIN (6) gestützt, die auch bei lokaler Infusion in psoriatische Läsionen nur in einem von zehn Fällen einen therapeutischen Effekt sahen.

Wie erwähnt ist die Penetration an bestimmte Voraussetzungen gebunden, so dringen bekanntermassen Salze ausgesprochen schlecht von aussen in die Haut ein. Vielmehr ist man immer bestrebt, Säuren bei einem pH anzuwenden, bei dem sie möglichst weitgehend undissoziiert vorliegen. Dasselbe gilt im übrigen für Basen.

Schliesslich liegt der Verdacht nahe, dass eine Penetration in Gegenwart von Calciumionen besonders behindert wird, weil sich mit diesem Kation leicht schwer lösliche Salze bilden. Dieses ist z.B. bekannt von Tetracyclinen.

Aus dem vorher gesagten ergab sich folgende Thematik für die vorliegende Dissertation:

Es sollte die Penetration von Methotrexat unter verschiedenen Bedingungen in die menschliche Haut bestimmt werden, und zwar sollten die relativen und die absoluten Konzentrationen in den einzelnen Hautschichten erfasst werden. (Relativ, das heisst in Bezug auf die applizierte Menge die aufgetragen wurde, absolut das bedeutet Mengen in den einzelnen Schichten, bezogen auf ein Einheitsvolumen der jeweiligen Hautschicht.)

Hierdurch sollte zunächst festgestellt werden, welche Konzentrationen in den teilungsfähigen Schichten der Haut zu erwarten sind.

Weiter sollten die Untersuchungen den Zeitverlauf der Penetration erkennen lassen, das heisst in etwa einen Hinweis dafür gestatten, mit welcher Geschwindigkeit die Penetration abläuft.

Schliesslich sollte durch Zugabe des Komplexbildners EDTA ein eventueller Einfluss von Calciumionen, sowie durch Ansäuern die Abhängigkeit vom pH untersucht werden.

Diese Arbeit wurde dankenswerterweise von der deutschen Forschungsgemeinschaft (Förderungsprogramm "Permeationskinetik", Kennzeichen SCH-A-213/4) unterstützt.

MATERIAL und METHODIK

1 a) Verwendete Substanzen und Lösungen

Aus käuflichen Ampullen (Methotrexate Sodium, Firma Lederle) wurden folgende drei Lösungen hergestellt:

Lösung 1 0,1 %ige wässrige Methotrexatlösung

Lösung 2 0,1 %ige wässrige Methotrexatlösung
+ 1 % Titriplex III^(R) (EDTA)

Lösung 3 0,1 %ige wässrige Methotrexatlösung
+ 1 % Titriplex III^(R) (EDTA)
Die Gesamtlösung wurde mit HCL auf pH 2,5
eingestellt.

Tritium markiertes Methotrexat (3-5-9(n)- 3H-Methotrexat) wurde als Natriumsalz von der Firma Radiochemical Center Amersham bezogen. Die Substanz hatte eine spezifische Aktivität von 6 C/mMol, das heisst 13 mC/mg.

Die radiochemische Reinheit wurde durch Radiopapierchromatographie überprüft.

Radiochemische Reinheit in n-Butanol:Pyridin:Wasser System (1:1:1) 97 %.

Eine Konzentrationsänderung durch den Zusatz des radiomarkierten Methotrexates konnte wegen der hohen spezifischen Aktivität ausser Acht bleiben.

Zu den Lösungen wurde 3H-Methotrexat zugesetzt, sodass die

Lösung 1 eine spezifische Aktivität von $5 \mu\text{C}/5 \mu\text{l}$

Lösung 2 " " " von $15 \mu\text{C}/5 \mu\text{l}$

Lösung 3 " " " von $6,5 \mu\text{C}/5 \mu\text{l}$
enthielt.

1 b) Benötigte Reagenzien bei der Aufarbeitung der Haut

Zur Durchführung der späteren radiometrischen Messung wurden alle anzufertigenden Proben mit folgendem Scintillationscocktail versetzt:

Scintillator: 0,8 % (40 g) Butyl-PBD 2-(4-tert.-Butyl-phenyl)-5-(4-biphenyl)-1,2,3-oxadiazol (Fa. Zinsser, Frankfurt)

Lösungsvermittler: 12 Vol% (300 ml) BBS-3 (Fa. Beckman)
ad 100 (5l) Toluol p.a. (Fa. Merck)

Zur Messung der Hauthydrolysate benutzten wir zu dem obigen Cocktail einen Zusatz von 60 ml 5%iger Essigsäure zur Neutralisation der bei der Hydrolyse benötigten Natronlauge.

2) Haut

Bei den Versuchen kam Leichenhaut zur Anwendung (Bauch-

haut), die spätestens zwei Tage post mortem im Pathologischen Institut des Rudolf-Virchow-Krankenhauses⁺⁾ entnommen wurde.

Es wurde darauf geachtet, dass diese frei von jeglichen pathologischen Veränderungen war. Nach der Entnahme wurde die Haut sorgfältig an der Subcutis-Grenze abgetrennt, in die für die Versuche notwendige Grösse zugeschnitten, in Aluminiumfolie verpackt und kurzzeitig bei - 35°Celsius eingelagert.

Vor dem Versuch erfolgte das Auftauen und Reinigen der Haut. Mit einem Stempel wurde eine 2 cm² grosse kreisrunde Fläche gekennzeichnet und mit Hilfe einer Eppendorfpipette 5 Mikroliter jeweils einer der oben genannten Lösungen aufgetragen und mit der Pipettenspitze vorsichtig einmassiert.

3) Beschreibung der Apparatur zur Messung des Penetrationsvorganges

Der Penetrationsvorgang erfolgte jeweils in einer der vier in Reihe geschalteten Penetrationskammern (Abb.1, Abb.2). Die Kammern sind folgendermassen aufgebaut:

Eine Penetrationskammer besteht aus zwei voneinander getrennten, 3 cm hohen, doppelwandigen Glaskörpern, von denen einer den oberen und einer den unteren

⁺⁾ Wir danken Prof.Dr. Stein für die freundliche Ueberlassung von Leichenhaut zu experimentiellen Zwecken.

Kammeranteil darstellt. Der Abstand zwischen den Wänden der Doppelwand beträgt 1 cm. Der untere Kammeranteil, dessen innerer Durchmesser 1,6 cm beträgt, ähnelt einer abgeflachten doppelwandigen Halbkugel. Der obere Kammeranteil ist vom gleichen inneren Durchmesser wie der untere und zeigt eine Oeffnung, die nach oben hin immer schmaler werdend in einem Belüftungsrohr endet. (Abb.5)

Zur Temperierung sind die beiden Kammern in ihrer Doppelwandung an einen Warmwasserkreislauf angeschlossen. Die Wasserpumpe dieses Verbundsystemes steht in einem Wasserbad, das durch einen Thermostaten auf 32°Celsius gehalten wird.

4) Durchführung des Penetrationsvorganges

Die vier hintereinander geschalteten Penetrationskammern standen auf Magnetrührern. Zur Vorbereitung der Kammer zur Penetration wurden 17 ml physiologische Kochsalzlösung, im folgenden als das sogenannte Penetrationskammerwasser bezeichnet, in den offenen Hohlraum der unteren Penetrationskammer gefüllt. Da die Haut zwischen die beiden Kammeranteile der Penetrationskammer gespannt wurde, musste die Kontaktstelle beider Teile mit einer Silikonpaste bestrichen werden, die ein späteres Abrutschen der Haut in das Penetrationskammerwasser verhinderte. Das durch ein teflonüberzogenes Metallstäbchen ständig durchmischte Penetrationskammerwasser hatte während des Versuchs permanent Kontakt mit der Hautunterseite.

Beim Penetrationsvorgang wurde die mit radiomarkierter Methotrexatlösung vorbehandelte Haut mit der Unterseite auf den mit Silikonpaste bestrichenen planen Anteil der Doppelwand der unteren Kammer gelegt. Die auf der Haut gekennzeichnete Fläche bedeckte genau die Oeffnung des Hohlraumes, der das Penetrationskammerwasser enthält. Nun wurde der obere Kammeranteil auf den unteren gesetzt, ohne die gekennzeichnete Hautstelle zu berühren und an diesem mit aussen angreifenden Gummilaschen fixiert. Die Luftzufuhr an die Hautoberfläche gewährleistete das Belüftungsrohr des oberen Kammeranteils. Die Haut befand sich nun zwischen beiden Teilen der Penetrationskammer.

Als Penetrationszeit wurden pro angegebener markierter Methotrexatlösung jeweils 30,100,300 und 1000 Minuten gewählt.

Nach Beendigung des Versuches wurde die Haut mit ihrer gekennzeichneten Fläche zur weiteren Bearbeitung auf eine in der Grösse identischen, elastischen Hartgummiunterlage gelegt und, ohne die Haut einem grösseren Zug auszusetzen, an den Seiten der Gummiiunterlage mit acht Metallnadeln fixiert.

5) Aufarbeitung der Haut

Da der überwiegende Teil der Methotrexatlösung höchstwahrscheinlich auf der Hautoberfläche verbleiben könnte, wurde nach Beendigung der Penetration die auf

der Hartgummiunterlage befestigte Haut zuerst mit trockener Watte dreimal abgewischt.

Die Wattebäuschchen wurden in einem mit 100 ml Scintillationscocktail gefüllten Plastikgefäß eluiert. Zur späteren Aktivitätsbestimmung erfolgte dann die Gabe von 1 ml dieses Cocktails in ein mit 15 ml Scintillationscocktail aufgefülltes Zähl- oder Messfläschchen (Fa. Zinsser, Frankfurt).

Nun wurde nach der Methode von PINKUS (5) und WOLF (4) die Hornschicht mit Tesafilm^(R) (Fa. Baierdorf) schichtweise entfernt. Diese sogenannte Stripping-Technik ermöglicht ein gleichmässiges Abtragen des Stratum Corneum. Die verwendeten Tesafilmstreifen waren 8 cm lang und 3 cm breit. Sie überragten damit das behandelte Hautareal. Ein feuchter Glanz der gestrippten Oberfläche deutete an, dass die Hornschicht in toto abgetragen war.

Die einzelnen Tesafilmabrisse wurden nun jeweils in ein Zählfläschchen gegeben und mit 15 ml Scintillationscocktail versetzt und direkt im Liquid-Scintillations-Analyser gemessen.

Voruntersuchungen ergaben, dass sich die Klebeschicht des Tesafilms im Scintillationscocktail löst und auch die ungelösten Anteile die Messung der Aktivität nicht störend beeinflussen.

Zur weiteren Aufarbeitung von Epidermis und Corium wurde aus der Haut ein kreisrundes 28 mm^2 grosses Stück herausgestantzt und auf einem Gefrieremikrotom (Fa. Jung, Heidelberg) aufgefroren.

Nun erfolgte das Aufschneiden des tiefgefrorenen Gewebes in Hautschnitte von $10 \mu\text{m}$ bzw. $40 \mu\text{m}$ Stärke und das Transportieren der Schnitte in je ein Messfläschchen.

Da die Dicke der Epidermis zwischen 100 und $200 \mu\text{m}$ variiert, konnten die ersten 16 Hautschnitte von $10 \mu\text{m}$ Dicke in einer grob vereinfachten Annäherung der Epidermis zugerechnet werden. Der verbleibende Rest wurde dem Corium zugerechnet und in $40 \mu\text{m}$ dicke Schnitte zerlegt.

Um eine gewisse Hydrolyse der Gewebeproben vor der Messung zu erzielen, erfolgte die Zugabe von $0,3 \text{ ml}$ $0,5$ normaler Natronlauge und sechs Stunden langes Aufbewahren im Wärmeschränk bei 75°Celsius . Danach wurden die Proben mit 15 ml des Scintillationscocktails gefüllt, der zur Neutralisierung der Natronlauge die angegebene Menge an Essigsäure enthielt. Damit waren die Hautschnitte nach Abklingen der Lumineszenzen nach 30 Minuten zur Radioaktivitätsmessung fertig.

Da damit zu rechnen war, dass Methotrexat durch die gesamte Haut penetriert war und sich im Penetrationskammerwasser angereichert hatte, wurde dieses ebenfalls zur Aktivitätsmessung vorbereitet. $0,3 \text{ ml}$ der Flüssigkeit wurde entnommen, in ein Zählfläschchen gefüllt und 15 ml Scintillationscocktail dazugegeben.

6) Aktivitätsmessung

Die Messung der Aktivität aller angefertigten Proben erfolgte direkt im Liquid-Scintillations-Analyser (LSA) (Fa. Beckman) mit angeschlossener Teletype und Lochstreifenstanzer.

Zum übersichtlichen Vergleich der Messergebnisse konnten die auf den Lochstreifen übertragenen Messwerte an einer Diehl-Algatron-Rechenanlage mit einem eigens dafür aufgestellten Programm in dpm/cm^2 , bzw. dpm/ml und dpm/Gesamtvolume n umgerechnet werden. Damit sollte die wiedergefundene Aktivität in Hornschicht, Epidermis und Corium ein direktes Mass für das Eindringen der markierten Substanz in die entsprechenden Hautschichten darstellen.

7) Bilanzierung des Aktivitätsverbleibs

Da die auf die Haut aufgetragene Aktivitätsmenge bekannt ist, können die wiedergefundenen Aktivitäten in der Hornschicht, Epidermis, Corium, Penetrationskammerwasser und im Wattebausch in Prozent der insgesamt aufgetragenen Aktivitätsmenge wiedergegeben werden.

Wegen der bekannten messtechnischen Probleme bei Versuchen mit Isotopen, sowie der speziellen Probleme der hier angewandten Untersuchungsanordnung (z.B.

Anhaften von Substanz an der Penetrationskammer, Spreiten der Zubereitungen über die Hautoberfläche) ist mit einer Bilanzierung der Ausbeuten der aufge-

tragenen Aktivität auf 100% nicht zu rechnen. Dies ist jedoch von untergeordneter Bedeutung, da die Konzentrationsberechnungen stets die gesamte aufgetragene Menge und diese wiederum die jeweils neu bestimmte spezifische Aktivität zur Basis haben.

8. U m r e c h n u n g d e r M e s s w e r t e

a) Bestimmung der wiedergefundenen Aktivitäten der Hornschicht, Epidermis und Corium in % der aufgetragenen Aktivität

a 1) Berechnung der aufgetragenen Aktivität

Wie beschrieben wurde mit folgenden Lösungsmengen und Aktivitäten gearbeitet:

Lösung I $5 \mu\text{l} \hat{=} 5 \mu\text{C}$

Lösung II $5 \mu\text{l} \hat{=} 15 \mu\text{C}$

Lösung III $5 \mu\text{l} \hat{=} 6,5 \mu\text{C}$

Berechnung der aufgetragenen Aktivität am Beispiel Lösung I. Es gilt:

$5 \mu\text{C}$ sind in $5 \mu\text{l}$ Lösung enthalten.

$$1 \mu\text{C} = 2,23 \cdot 10^6 \text{ dpm}$$

Daraus folgt, dass die Lösung

$5 \cdot 2,23 \cdot 10^6$ dpm enthält.

Sei A die tatsächlich aufgetragene Lösungsmenge (μl), die auf einer Fläche von 2 cm^2 verteilt wurde, dann folgt

$$\frac{2,23 \cdot 10^6 \cdot A \cdot \text{dpm} \cdot \mu\text{l}}{2 \cdot \text{cm}^2 \cdot \mu\text{l}}$$

= auf die Haut aufgetragene Aktivität $\frac{\text{dpm}}{\text{cm}^2}$

Gegeben ist die gemessene Aktivität der Hornschicht $\frac{\text{dpm}}{\text{cm}^2} = y$

Epidermis $\frac{\text{dpm}}{\text{cm}^2} = z$

und Corium $\frac{\text{dpm}}{\text{cm}^2} = a$

a 2) Bestimmung der relativen Aktivitätsmenge

$$100 \% = \frac{2,23 \cdot 10^6 \cdot A \cdot \text{dpm}}{2 \cdot \text{cm}^2}$$

$$x \% = y \cdot \frac{\text{dpm}}{\text{cm}^2}$$

Als Beispiel für die Hornschicht:

$$x \% = \frac{100 \cdot y \cdot 2 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dpm}}{2,23 \cdot 10^6 \cdot A \cdot \text{dpm} \cdot \text{cm}^2}$$

Im analogen Rechengang bei Lösung II

$$x \% = \frac{100 \cdot y \cdot 5 \cdot 2 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dpm}}{15 \cdot 2,23 \cdot 10^6 \cdot A \cdot \text{dpm} \cdot \text{cm}^2}$$

Lösung III

$$x \% = \frac{100 \cdot y \cdot 5 \cdot 2 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dpm}}{6,5 \cdot 2,23 \cdot 10^6 \cdot A \cdot \text{dpm} \cdot \text{cm}^2}$$

b) Bestimmung der Substanzmenge in $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ Gewebe

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass für die Dicke der Hornschicht ein mittlerer Wert von $20 \mu\text{m}$ angenommen werden darf. Die sehr variable Epidermisdicke wurde in grober Annäherung für einen Mittelwert von $160 \mu\text{m}$ festgelegt. Die Summe der gewonnenen $40 \mu\text{m}$ Horizontalschnitte ergibt als Mittelwert bei 27 Coriumpuben eine durchschnittliche Dicke des Coriums von $1080 \mu\text{m}$.

b 1) Bestimmung der Absolutmenge der Substanz in $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ in der Hornschicht

Es gilt:

1. In $5 \mu\text{l}$ Lösung sind $5 \mu\text{g}$ unmarkierte Substanz gelöst ($0,1$ %ige Lösung).

2. $5 \mu\text{g}$ unmarkierter Substanz werden mit $5 \mu\text{C}$ markierter Substanz versetzt.

3. $1 \mu\text{C} = 2,23 \cdot 10^6 \text{ dpm}$

daher entsprechen $1 \mu\text{g} = 2,23 \cdot 10^6 \text{ dpm}$

Im analogen Rechengang für Lösung II

$$1 \mu\text{g} = \frac{15 \cdot 2,23 \cdot 10^6 \text{ dpm}}{5}$$

für Lösung III

$$1 \mu\text{g} = \frac{6,5 \cdot 2,23 \cdot 10^6 \text{ dpm}}{5}$$

Gegeben ist die gemessene Aktivität in der Hornschicht bezogen auf 1 cm^2 Hautoberfläche und $20 \mu\text{m}$ Dicke.

Gesucht: Wieviel $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ entsprechen den in der Hornschicht gefundenen dpm ?

$$\text{also: } x \mu\text{g} = \frac{y \cdot \text{dpm}}{\text{cm}^2 \cdot 20 \mu\text{m}}$$

wenn y ist gemessene dpm in der Hornschicht.

Nach einem Volumen von 1 cm^3 aufgelöst ergibt sich:

$$x \mu\text{g} = \frac{y \text{ dpm}}{20 \cdot 10^{-4} \cdot \text{cm}^3}$$

$$x \mu\text{g} = \frac{y \text{ dpm} \cdot 10^4}{20 \cdot \text{cm}^3}$$

$$x \mu\text{g} = \frac{y \cdot 500 \text{ dpm}}{\text{cm}^3}$$

da $1 \mu\text{g} = 2,23 \cdot 10^6 \text{ dpm}$
sind, ergibt sich für

$$x = \frac{\mu\text{g} \cdot y \cdot 500 \text{ dpm}}{2,23 \cdot 10^6 \cdot \text{dpm} \cdot \text{cm}^3}$$

Im analogen Rechengang zu Lösung II

$$x = \frac{\mu\text{g} \cdot y \cdot 500 \cdot 5 \text{ dpm}}{15 \cdot 2,23 \cdot 10^6 \cdot \text{dpm} \cdot \text{cm}^3}$$

Lösung III

$$x = \frac{\mu\text{g} \cdot y \cdot 500 \cdot 5 \text{ dpm}}{6,5 \cdot 2,23 \cdot 10^6 \cdot \text{dpm} \cdot \text{cm}^3}$$

b 2) Bestimmung der Absolutmenge der Substanz in
 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ in der Epidermis.

Es gelten die gleichen Bestimmungen (1. - 3.) wie unter
1. aufgeführt.

Gegeben ist die gemessene Aktivität in der Epidermis
bezogen auf 1 cm^2 Hautoberfläche und $160 \mu\text{m}$ Dicke.

Gesucht: Wieviel $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ entsprechen den in der Epidermis
gefundenen dpm ?

$$\text{Also: } x \mu\text{g} = \frac{z \cdot \text{dpm}}{160 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3} = \frac{z \cdot \text{dpm} \cdot 10^4}{160 \text{ cm}^3} = \frac{z \cdot 62,5 \text{ dpm}}{\text{cm}^3}$$

Es folgt der analoge Rechengang, wie bei der Hornschicht beschrieben wurde, so dass schliesslich folgende Formel erhalten wird.

$$x = \frac{\mu\text{g} \cdot z \cdot 62,5}{2,23 \cdot 10^6 \cdot \text{cm}^3}$$

Im analogen Rechengang für Lösung II

$$x = \frac{\mu\text{g} \cdot z \cdot 62,5 \cdot 5}{15 \cdot 2,23 \cdot 10^6 \text{ cm}^3}$$

Für Lösung III

$$x = \frac{\mu\text{g} \cdot z \cdot 62,5 \cdot 5}{6,5 \cdot 2,23 \cdot 10^6 \text{ cm}^3}$$

b 3) Bestimmung der Absolutmenge der Substanz in $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ im Corium.

Gegeben ist die gemessene Aktivität im Corium bezogen auf 1 cm^2 Hautoberfläche und $1080 \mu\text{m}$ Dicke.

Gesucht: Wieviel $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ entsprechen den im Corium gefundenen dpm ?

$$\text{Also: } x \mu\text{g} = \frac{a \cdot \text{dpm}}{\text{cm}^2 \cdot 1080 \mu\text{m}}$$

wenn a = gemessene dpm im Corium. Nach einem Volumen von 1 cm^3 ergibt sich:

$$x \mu\text{g} = \frac{a \cdot \text{dpm}}{1080 \cdot 10^{-4} \cdot \text{cm}^3}$$

$$= \frac{a \cdot 9,26 \text{ dpm}}{\text{cm}^3}$$

Es folgt der analoge Rechengang wie er bei der Hornschicht beschrieben wurde, so dass schliesslich für Lösung I folgende Formel erhalten wird:

$$x = \frac{\mu g \cdot z \cdot 9,26}{2,23 \cdot 10^6 \text{ cm}^3}$$

Im analogen Rechengang zu Lösung II

$$x = \frac{\mu g \cdot z \cdot 9,26 \cdot 5}{15 \cdot 2,23 \cdot 10^6 \text{ cm}^3}$$

Für Lösung III

$$x = \frac{\mu g \cdot z \cdot 9,26 \cdot 5}{6,5 \cdot 2,23 \cdot 10^6 \text{ cm}^3}$$

c) Bestimmung der Konzentrationen in mol/cm³ und Molarität

Berechnet ist bereits die Menge der Substanz in $\mu g/\text{cm}^3$, da per def.

$$\text{Molarität} = \frac{\text{g}}{\text{Molekulargewicht}} \quad \text{und}$$

$$\mu\text{Molarität} = \frac{\mu g}{\text{Molekulargewicht}}$$

ist, ergibt sich bei Division durch das Molgewicht die Konzentration in Mol/cm^3 bzw. $\mu\text{Mol}/\text{cm}^3$.

$$\mu\text{Mol}/\text{cm}^3 = \frac{x \mu g}{\text{Molekulargewicht} \cdot \text{cm}^3}$$

weiter, da 1 Mol/l = 1 molar(m) entsprechen
 1 mMol/ml = 1 m ist, folgt daraus
 1 μ Mol/ml = 1 m . 10^3
 also 1 Mol/cm³ = 1 m . 10^3

$$\text{oder } 1 \text{ m} = \frac{x / \mu\text{g}}{\text{Molekulargewicht} \cdot \text{cm}^3} \cdot 10^3$$

$$10^{-3} \text{ m} = \frac{x / \mu\text{g}}{\text{Molekulargewicht} \cdot \text{cm}^3}$$

ERGEBNISSE

Entsprechend dem in der Einleitung dargestellten Arbeitsprogramm, ergab sich bei der Untersuchung ein umfangreiches Zahlenmaterial. Bei jedem Einzelversuch wurde die Hornschicht zunächst einmal in 3-20 Tesafilmaufbrisse aufgetrennt, die Epidermis in sechzehn $10\text{ }\mu\text{m}$ Schnitte, das Corium in bis zu 50 Einzelschnitte von $40\text{ }\mu\text{m}$, je nach Dicke der Gesamthaut.

Jede einzelne der genannten Proben wurde getrennt gemessen. Das sich so zunächst ergebende Zahlenmaterial ist an einem Beispiel in Tabelle 1, 2 und 3 zusammengestellt, indem die Penetration über einen Zeitraum von 300 Minuten herausgegriffen wurde.

Entsprechend den gezeigten Beispielen konnten die Daten für die Penetrationszeiten 30, 100, 300 und 1000 Minuten, sowie für die Lösungen 1,2 und 3 gewonnen werden.

Die in den einzelnen Schichten wiedergefundenen Aktivitäten und über das Rechenprogramm in dpm umgeformten Zerfälle wurden zunächst in Bezug gesetzt zu der insgesamt aufgetragenen Aktivität und als Prozentwerte ausgedrückt (Tabelle 4,5,6).

Hierbei zeigt sich generell, dass jeweils nur ein kleiner Anteil der aufgetragenen Aktivität in der

Haut als Ganzem wiedergefunden wurde. Nur zwischen 5 und 38 % wurden von der Haut aufgenommen, der Rest abgewiesen, das heisst er blieb auf der Oberfläche und war abzüglich der auf S. 15 genannten Fehlerquellen mit Watte abreibbar.

Von dem Anteil, den die Haut aufnahm, findet sich der grösste Teil wiederum stets in der Hornschicht.

In analoger Weise wurden nun mit Hilfe der in Material und Methodik dargestellten Formeln die Absolutkonzentrationen in den einzelnen Schichten der Haut errechnet und in Tabelle 7 und 8 dargestellt. Hierbei ist zu beachten, dass von zwei grundlegend unterschiedlichen Betrachtungsweisen ausgegangen wird:

Die Angabe $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ besagt, dass in dem Epidermisgewebe von $160\ \mu\text{m}$ Dicke unter einer Gesamtfläche von $1\ \text{cm}^2$ die angegebene Menge wiedergefunden wird. Ebenso ergeben sich im corialen Gewebe mit einer rechnerischen Gesamtdicke von $1080\ \mu\text{m}$ unter der Oberfläche von $1\ \text{cm}^2$ also Absolutkonzentrationen bezogen auf eine Einheitsschicht.

Die Angabe $\mu\text{g}/\text{ml}$ andererseits gibt an wieviel Substanz in 1 ml des jeweiligen Gewebes wiedergefunden wird. Durch Einsetzen des Molekulargewichtes von Methotrexat lässt sich hieraus die molare Konzentration im jeweiligen Gewebe errechnen.

Durch diese unterschiedliche Betrachtungsweise soll zum Ausdruck gebracht werden, dass die Epidermis als Oberhaut als erste von dem Medikament erreicht wird, hier also stets grössere Konzentrationen zu finden sind, die Schicht insgesamt aber sehr viel dünner ist, als das Corium, das später erreicht wird.

Entsprechend stellen sich dann beim Vergleich zwischen Epidermis- und Coriumkonzentration unterschiedliche Verhältnisse ein, Dies sei an einem Beispiel erläutert:

Betrachtet man die Penetrationszeit 100 Minuten bei Lösung I, so stellen annähernd gleiche Substanzmengen pro cm^2 darunterliegender Schicht in Epidermis und Corium (0,015 und 0,012 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) völlig unterschiedliche Konzentrationen bezogen auf das Einheitsgewebe dar, nämlich 0,96 μg in 1 ml Epidermisgewebe und nur 0,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Coriumgewebe, da eben im Corium dieselbe Substanzmenge sich auf ein weitaus dickeres Gewebe verteilt.

Schaut man zunächst auf die Werte in Bezug auf die Lösung I, sowohl in der Prozent, als auch in der absoluten Darstellungsweise, so fällt folgendes auf:

In der Hornschicht, wie auch in der Epidermis und im Corium ergibt sich ein deutlicher Zeitverlauf. Zunächst steigen die Konzentrationen an, um nach langen Penetrationszeiten wieder abzufallen.

Das Maximum in der Hornschicht stellt sich hierbei eindeutig früher ein als in der Epidermis und im Corium, nämlich nach 100 Minuten im Vergleich zu 300 Minuten. Geht man von den Prozentwerten zu den absoluten Konzentrationen über, so kann schon hier gesagt werden, dass mit einer maximalen Konzentration von ca. $14 \mu\text{Mol}$ in der Epidermis bzw. ca. $1 \mu\text{Mol}$ im Corium von einer mangelnden Penetration bzw. Permeation in vitro nicht gesprochen werden kann.

Die Ergebnisse, wie sie sich in Tabelle 1 - 3 darstellen, wurden in jedem Falle auch in Kurvenform ausgewertet. Zunächst wurden die dpm/cm^2 eines einzelnen Hornhautabrisses bzw. Hautschnittes aufgetragen. Dies ist an einem Beispiel (Abb. 3) für Lösung II, Penetrationszeit 30 Minuten, dargestellt. Hierbei ist anzumerken, dass die Werte von jeweils vier $10 \mu\text{m}$ dicken Epidermisschnitten addiert wurden, um sie denen der $40 \mu\text{m}$ dicken Coriumsnitte vergleichbar zu machen. (Ebenso wurde in Abb. 4 verfahren).

Dann erfolgte die Umformung der Werte in die Molartät in dem jeweiligen Schichtausschnitt. Damit lässt sich aus diesen Kurven direkt die molare Konzentration in den jeweiligen Zellagen ablesen.

In Abb. 4 werden die erhaltenen Werte von Epidermis und Corium bei den verschiedenen Penetrationszeiten

am Beispiel von Lösung I in einer Abbildung gezeigt. Dabei wurde bewusst auf eine photographische Wiedergabe der gezeichneten Kurven verzichtet, um durch die Originalgrösse eine übersichtlichere Darstellung zu erreichen. Wie man sieht, sind nach kurzen Penetrationszeiten kleine Mengen von Methotrexat in den tiefsten Lagen des Coriums zu finden. Zu diesem Zeitpunkt streuen die Werte noch stark.

Nach einer Penetrationszeit von 100 Minuten erkennt man einen deutlichen Konzentrationsgradienten von der Epidermis bis ins tiefe Corium mit einem leichten Anstieg im unteren corialen Anteil.

Nach 300 Minuten wird dieser Gradient noch flacher und die Konzentration im tiefen Corium steigen weiter an.

Nach 1000 Minuten schliesslich sinken sie zwar wieder ab, die Kurvenform deutet jedoch auf eine Anreicherung in den tiefen corialen Schichten hin.

Mit längeren Penetrationszeiten hat sich also insgesamt der Gradient abgeflacht, mit anderen Worten die anfangs deutlichen Unterschiede zwischen epidermalen und corialen Konzentration haben sich nivelliert. Weiter lässt sich auch aus diesen Kurven

ablesen, dass als Maximum, nämlich nach 300 Minuten, in der Epidermis ca $7 \cdot 10^{-6}$ molare Konzentrationen und im tiefen Corium noch $2 \cdot 10^{-6}$ molare Konzentrationen anzutreffen sind.

TABELLE 1

Nach Aufarbeitung der Haut in den einzelnen Schichten in Hornschicht, Epidermis und Corium sowie im Penetrationskammerwasser und in den Wattebäuschchen wiedergefundene Aktivität in dpm/cm^2 . Penetrationszeit 300 Minuten. Aufgetragene Menge $5 \mu\text{g}$ Methotrexat, spezifische Aktivität $5 \mu\text{C} \hat{=} 11439900 \text{ dpm}/2 \text{ cm}^2$ (Lösung I).

<u>Hornschicht</u> (Tesafilmabrisse)	<u>Epidermis</u> ($10 \mu\text{m}$ Schnitte)	<u>Corium</u> ($40 \mu\text{m}$ Schnitte)
1) 448390	1) 74264	1) 13114
2) 116436	2) 14857	2) 3182
3) <u>93118</u>	3) 2714	3) 4430
657944 dpm/cm^2	4) 7120	4) 3039
	5) 7161	5) 2770
	6) 13445	6) 2027
	7) 4966	7) 2098
	8) 12084	8) 2320
	9) 6130	9) 580
	10) 15307	10) 1598
	11) 19618	11) 484
	12) 8287	12) 3059
	13) 2255	13) 400
	14) 30516	14) 966
	15) 4420	15) 609
	<u>16) 9580</u>	16) 814
	232718 dpm/cm^2	17) 966
		18) 559
		19) 743
		20) 820
		Weiterführung der
		Tabelle siehe nächste
		Seite (S.32)

Zu Tabelle 1)

Penetrationskammer-
wasser 6081 dpm/3,4 ml

Wattebäuschchen
1138022 dpm/100 ml

Corium
(40 μ m Schnitte)

21)	645
22)	789
23)	1868
24)	511
25)	752
26)	848
27)	1877
28)	711
29)	932
30)	975
31)	1675
32)	943
33)	932
34)	114
35)	984
36)	705
37)	634
38)	675
39)	1548
40)	1498
41)	1436
42)	2132
43)	1820
44)	1714
45)	3023
46)	6023

78520 dpm/cm²

TABELLE 2

Nach Aufarbeitung der Haut in den einzelnen Schichten in Hornschicht, Epidermis und Corium, sowie im Penetrationskammerwasser und in den Wattebüschchen wiedergefundene Aktivität in dpm/cm^2 . Penetrationszeit 300 Minuten. Aufgetragene Menge $5 \mu\text{g}$ Methotrexat, spezifische Aktivität $15 \mu\text{C} \hat{=} 33860480 \text{ dpm/2 cm}^2$ (Lösung II).

<u>Hornschicht in dpm/cm^2</u>	<u>Epidermis in dpm/cm^2</u>	<u>Corium in dpm/cm^2</u>
(Tesafilmabriss)	(10 μm Schnitte)	(40 μm Schnitte)
1) 807859	1) 24940	1) 46077
2) 60037	2) 24557	2) 47756
3) 17507	3) 20300	3) 43821
4) 22578	4) 10729	4) 44470
907982 dpm/cm^2	5) 25156	5) 28820
	6) 8984	6) 81338
	7) 15805	7) 28187
	8) 28161	8) 33942
	9) 30064	9) 22284
	10) 15706	10) 45661
	11) 22519	11) 19940
Penetrationskammer-	12) 23893	12) 30088
wasser:	13) 29069	13) 18489
27188 dpm/3 ml	14) 13588	14) 26217
	15) 19076	15) 18935
Wattebüschchen:	16) 15165	16) 23936
10087 477 dpm/10 ml	327714 dpm/cm^2	17) 18575
		18) 23874
		19) 25918
		20) 24824
		21) 24077
		22) 23677
		23) 17819
		24) 16092
		25) 15388
		26) 19342
		27) 16862
		28) 36073
		822484 dpm/cm^2

TABELLE 3

Nach Aufarbeitung der Haut in den einzelnen Schichten in Hornschicht, Epidermis und Corium, sowie im Penetrationskammerwasser und in den Wattebüschchen wiedergefundene Aktivität in dpm/cm^2 . Penetrationszeit 300 Minuten. Aufgetragene Menge $5 \mu\text{g}$ Methotrexat, spezifische Aktivität $6,5 \mu\text{C} \hat{=} 14561111 \text{ dpm/2 cm}^2$ (Lösung III).

<u>Hornschicht in dpm/cm^2</u>	<u>Epidermis in dpm/cm^2</u>	<u>Corium in dpm/cm^2</u>
(Tesafilmabriss)	(10 μm Schnitte)	(40 μm Schnitte)
1) 622762	1) 566	1) 31793
2) 291876	2) 2420	2) 14125
3) 90545	3) 5684	3) 11177
4) 94291	4) 4623	4) 11905
5) 73001	5) 2386	5) 2307
6) 29577	6) 3825	6) 1568
7) 35087	7) 1811	7) 814
8) 59313	8) 5721	8) 2327
9) 22286	9) 3148	9) 618
10) 25744	10) 5309	10) 609
11) 17884	11) 8005	11) 364
12) 14193	12) 7584	12) 1309
1376557 dpm/cm^2	13) 21084	13) 536
	14) 40443	14) 361
	15) 18207	15) 632
	16) 13127	16) 464
Penetrationskammer-	143943 dpm/cm^2	
wasser:		17) 1057
7685 dpm/3,5 ml		18) 1180
		19) 534
		20) 384
		21) 273
Wattebüschchen:		22) 332
9624696 dpm/100 ml		23) 486
		24) 557
		25) 284
		26) 561
		27) 427
		28) 466
		29) 627
		30) 884
		31) 200
		32) 623
		33) 230
		90014 dpm/cm^2

TABELLE 4

In Hornschicht(HS), Epidermis(E), Corium(C) und Penetrationskammerwasser (UBW) wiedergefundene Substanzmenge in % der aufgetragenen Aktivität bei Lösung I (0,1 %ige wässrige Methotrexatlösung).

<u>Penetrationszeit (min)</u>	<u>% aufgetragene Aktivität</u>	
30'	HS	32,53
	E	3,45
	C	2,06
	UBW	0,05
100'	HS	20,07
	E	0,62
	C	0,49
	UBW	0,019
300'	HS	11,50
	E	4,07
	C	1,55
	UBW	0,053
1000'	HS	1,76
	E	2,73
	C	0,72
	UBW	0,059

TABELLE 5

In Hornschicht (HS), Epidermis (E), Corium (C) und Penetrationskammerwasser (UBW) wiedergefundene Substanzmenge in % der aufgetragenen Aktivität, Lösung II (0,1 %ige wässrige Methotrexatlösung + 1 % Titriplex III^(R)(EDTA)).

<u>Penetrationszeit (min)</u>	<u>% aufgetragene Aktivität</u>	
30'	HS	9,2
	E	0,09
	C	0,29
	UBW	0,001
100'	HS	6,2
	E	0,67
	C	0,79
	UBW	0,035
300'	HS	5,3
	E	1,94
	C	5,99
	UBW	0,080
1000'	HS	6,7
	E	1,19
	C	1,40
	UBW	0,040

TABELLE 6

In Hornschicht (HS), Epidermis (E), Corium (C) und Penetrationskammerwasser (UBW) wiedergefundene Substanzmenge in % der aufgetragenen Aktivität, Lösung III (0,1 %ige wässrige Methotrexatlösung + 1 % Titriplex III^(R) (EDTA) + HCL, Lösung auf pH 2,5 eingestellt).

<u>Penetrationszeit (min)</u>	<u>% aufgetragene Aktivität</u>	
30'	HS	20,155
	E	0,902
	C	0,477
	UBW	0,078
100'	HS	23,615
	E	1,258
	C	0,383
	UBW	0,022
300'	HS	18,91
	E	1,977
	C	1,384
	UBW	0,052
1000'	HS	19,90
	E	12,264
	C	2,008
	UBW	0,071

TABELLE 7

In Hornschicht (HS), Epidermis (E) und Corium (C)
wiedergefundene Substanzmenge in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Hautfläche,
 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hautgewebe und molarer Konzentration. Lösung I.

<u>Penetrationszeit</u>				
	<u>(min)</u>	<u>$\mu\text{g}/\text{cm}^2$</u>	<u>$\mu\text{g}/\text{ml}$</u>	<u>μMol</u>
30'	HS	0,813	406,675	894,774
	E	0,086	5,389	11,858
	C	0,052	0,491	1,079
100'	HS	0,502	250,850	551,925
	E	0,015	0,963	2,118
	C	0,012	0,117	0,258
300'	HS	0,288	143,800	316,392
	E	0,102	6,356	13,985
	C	0,039	0,368	0,811
1000'	HS	0,044	21,950	48,295
	E	0,068	4,263	9,378
	C	0,018	0,172	0,379

TABELLE 8

In Hornschicht (HS), Epidermis (E) und Corium (C)
wiedergefundene Substanzmenge in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Hautfläche,
 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hautgewebe und molarer Konzentration. Lösung II

Penetrationszeit

<u>(min)</u>		<u>$\mu\text{g}/\text{cm}^2$</u>	<u>$\mu\text{g}/\text{ml}$</u>	<u>μMol</u>
30'	HS	0,230	115,218	253,505
	E	0,002	0,154	0,338
	C	0,007	0,066	0,145
100'	HS	0,156	77,984	171,582
	E	0,017	1,041	2,290
	C	0,020	0,183	0,403
300'	HS	0,134	67,039	147,499
	E	0,048	3,025	6,655
	C	0,149	1,385	3,047
1000'	HS	0,135	67,354	148,195
	E	0,024	1,496	3,291
	C	0,028	0,259	0,571

TABELLE 9

In Hornschicht (HS), Epidermis (E) und Corium (C)
wiedergefundene Substanzmenge in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Hautfläche,
 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hautgewebe und molarer Konzentration. Lösung III.

<u>Penetrationszeit</u>				
<u>(min)</u>		<u>$\mu\text{g}/\text{cm}^2$</u>	<u>$\mu\text{g}/\text{ml}$</u>	<u>μMol</u>
30'	HS	0,504	251,937	554,317
	E	0,023	1,410	3,101
	C	0,012	0,114	0,250
100'	HS	0,590	295,187	649,476
	E	0,031	1,966	4,326
	C	0,010	0,091	0,201
300'	HS	0,473	236,342	520,003
	E	0,0494	3,089	6,797
	C	0,035	0,329	0,725
1000'	HS	0,498	248,785	547,381
	E	0,307	19,162	42,140
	C	0,050	0,478	1,051

DISKUSSION

Wenn man zur Ausgangsfrage Stellung nimmt, nämlich ob die Penetration von Methotrexat^(R) in die Haut behindert ist und demzufolge hieraus eine mangelnde Wirkung erklärt werden kann, oder ob ausreichende Substanzmengen an das Targetorgan, in diesem Falle an die lebenden Zellen der Basalis gelangen, so zeigen diese Ergebnisse, dass die Konzentrationen in den einzelnen Schichten der Haut hoch genug sind, um sich auf der molekularbiologischen Ebene damit auch therapeutisch auszuwirken. Von einer fehlenden Penetration kann offensichtlich nicht gesprochen werden.

Vielmehr sind diese Konzentrationen vergleichbar mit solchen, die für die experimentielle Hemmung von Enzymen angewandt wurden und deutliche Effekte zeigten (10, 12, 13).

So zeigten GRIGNANI (10) und Mitarbeiter, dass 10^{-8} molare Konzentrationen an Methotrexat^(R) ausreichen um die Dihydrofolsäurereduktase in Epidermishomogenaten zu 50 % zu hemmen.

Dagegen benötigten RAAB und GMEINER (11) millimolare Konzentrationen an Methotrexat^(R), um den Sauerstoffverbrauch Überlebender menschlicher Haut zu hemmen. Das heisst, dass dieser Effekt durch die Konzentrationen, wie sie hier in der menschlichen Haut gefunden wurden wohl nicht zu realisieren wäre.

Zur Hemmung von Enzymen wie der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der Laktat-Dehydrogenase benötigen sie 1 - 10 $\mu\text{g/ml}$ um erste Hemmeffekte nachzuweisen, das heisst in etwa den Bereich, der hier an Methotrexatkonzentrationen in der Epidermis nach längeren Penetrationszeiten zu erfassen ist.

Die Frage muss vielmehr umgekehrt gestellt werden, ob nicht Methotrexat^(R) mit einer so hohen Geschwindigkeit durch die Haut penetriert, dass nur in einem kurzen Zeitbereich diese Konzentrationen aufrecht erhalten werden.

So ist die bereits im Ergebnisteil beschriebene Beobachtung, dass nicht nur in der Epidermis, sondern auch im Corium bei Lösung I und Lösung II schon ein Maximum der Konzentrationen bei 300 Minuten Penetrationszeit gesehen wird und anschliessend die Konzentrationen wieder abfallen aussergewöhnlich. Dieser Befund spricht für ein schnelles Durchwandern der lebenden Hautschichten.

Geht man von der Arbeitshypothese aus, die zur Anwendung der Lösung II führte, nämlich dass durch EDTA Ca^{++} in der Hornschicht abgefangen und somit eine Fällung von Methotrexat^(R) verhindert wird, so ergibt sich zunächst, dass die Konzentrationen in der Hornschicht niedriger sind als nach Anwendung von Lösung I und auch konstanter. Mit anderen Worten

der Zusatz von einem Komplexbildner lässt eine Ansammlung von bis zu 20 %, wie sie bei der einfachen Lösung I gefunden wurde, nicht mehr zu. Mit Lösung II ergeben sich in der Epidermis und im Corium Konzentrationsmaxima nach 300 Minuten Penetrationszeit.

Überraschend ist nun, dass die epidermalen Konzentrationen bei Lösung II niedriger sind als bei Lösung I, die corialen Konzentrationen aber bei längeren Penetrationszeiten höher. Ein weiterer die Penetrationsraten erhöhender Effekt, wird durch den Zusatz von EDTA jedoch nicht erreicht.

Weiter kann festgestellt werden, dass auch bei Lösung III nicht von einer mangelnden Penetration ausgegangen werden darf. Vielmehr stellen sich, zumindest für einen definierten Zeitbereich, erhebliche Konzentrationen in den einzelnen Gewebeschichten ein.

Es fällt auf, dass die Konzentrationen in der Hornschicht besonders hoch sind. Die Penetration in die Epidermis und ins Corium ist etwas verzögert und erreicht erst nach 1000 Minuten ihr Maximum. Zu diesem Zeitpunkt werden dann die höchsten epidermalen Konzentrationen der gesamten Untersuchung angetroffen. Man darf annehmen, wie in der Einleitung erwähnt, dass die undissoziierte Säure des Methotrexates^(R) zumindest in die Hornschicht besser penetriert ist als ihre Salze.

Insgesamt kann aber behauptet werden, dass eine bestimmte stationäre Konzentration von Methotrexat^(R) in der Epidermis und im Corium nicht überschritten wird. Vielmehr besitzt die Substanz offensichtlich eine hohe Flussgeschwindigkeit.

An dieser Stelle muss weiterhin angemerkt werden, dass es sich hierbei um in vitro-Untersuchungen an der Haut handelt, wobei die normalen Funktionen des Gefäßsystems blockiert sind, Blut- und Lymphgefäße sind kollabiert.

In vivo befände sich direkt unterhalb der Epidermis der Kapillarbereich, der eine schnell fließende Substanz sicher mit hoher Geschwindigkeit drainieren würde. Wie die Erfahrungen der Arbeitsgruppe mit anderen Substanzen gezeigt haben, hat dies zur Konsequenz, dass nicht nur die corialen Konzentrationen, sondern, wegen der wechselseitigen Beeinflussung in Bezug auf die Diffusionsgeschwindigkeit, auch die epidermalen Konzentrationen erheblich niedriger sein können als sie hier vorgefunden werden.

Deutlich wird dieses durch die Kurvenverläufe in Abb. 3 und 4, die nach langen Penetrationszeiten eine Anreicherung der Substanz im tiefen Corium anzeigen. Man kann davon ausgehen, dass diese Substanzmengen bei intaktem Gefäß-System abtransportiert und damit in den Gesamtorganismus übergegangen wären.

Dies bedeutet wieder, dass die insgesamt fließende Substanzmenge in vivo eher höher sein kann, dass die im Fließgleichgewicht sich einstellenden Konzentrationen im Targetorgan jedoch niedriger ausfallen können.

Damit kann gesagt werden, dass die in der Einleitung angeführte Arbeitshypothese 1 zumindest zum Teil ihre Bestätigung gefunden hat.

Diese Ergebnisse schliessen jedoch nicht aus, dass ein Teil der in den einzelnen Hautschichten wiedergefundenen Radioaktivität gar nicht mehr einem intakten Methotrexatmolekül zuzuschreiben ist, sondern unter Umständen an der Hautoberfläche chemisch zersetztes oder in der Haut selbst metabolisiertes Methotrexat^(R), das heisst also Umwandlungsprodukte, darstellt.

Hiermit können aber auch die in der Einleitung alternativ aufgestellten Arbeitshypothesen 3 und 4 verstärktes Interesse erlangen:

Entweder Methotrexat bleibt schon deshalb in der lebenden Haut unwirksam, weil seine Effizienz eine Metabolisierung in der Leber voraussetzt, (von einer fehlenden Effizienz wegen mangelnder Penetration und Konzentration in vitro kann anscheinend ja nicht ausgegangen werden) oder im Fließgleichgewicht gerät nicht so viel Methotrexat^(R) an das Targetorgan, dass es die durch den Blutstrom herangetragene Konzentration an Folsäure in ausreichendem Masse kompetetiv verdrängen könnte.

Diese Fragestellungen beinhalten unter anderem das Problem der Bestimmung der Folsäurekonzentrationen im Gewebe und müssen demzufolge späteren Untersuchungen vorbehalten werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Behandlung von proliferativen Erkrankungen der Haut, so zum Beispiel der Psoriasis, hat es nicht an Versuchen gefehlt, Methotrexat^(R) lokal anzuwenden.

Bis auf wenige Ausnahmen sind sich die Autoren darin einig, dass die lokale Anwendung von Methotrexat^(R) der systemischen Applikation weitaus unterlegen ist. Die Ursachen hierfür liegen weitgehend im Dunkeln.

Diese Arbeit hatte sich zum Ziel gesetzt, durch Auftragen von 3H-Methotrexat^(R) auf Leichenhaut Aussagen über das Penetrations- bzw. Permeationsverhalten des Pharmakons in vitro zu machen.

Es wurden 5 μg des radiomarkierten Medikaments in 5 μl wässriger Lösung auf 2 cm^2 Hautoberfläche aufgetragen und Penetrationszeiten von 30, 100, 300 und 1000 Minuten gewählt.

Anschliessend wurde die Hornschicht in Tesafilmbalancen, Epidermis und Corium in Hautschnitte von 10 μm bzw. 40 μm Dicke zerlegt und diese Proben einzeln in einem Liquid-Scintillations-Analyser gemessen.

Hier kann nun gesagt werden, dass die maximalen Konzentrationen der Substanz in der Epidermis 19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gewebe bzw. 42 μMol , im Corium 1,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gewebe bzw. 3 μMol betragen.

Diese Konzentrationen sind durchaus vergleichbar mit denen, die andere Autoren zur signifikanten Hemmung verschiedener Enzyme, z.B. in Epidermis-homogenaten, benötigen.

Es kann offensichtlich davon ausgegangen werden, dass von einer mangelnden Penetrationsfähigkeit von Methotrexat^(R) in vitro nicht gesprochen werden kann.

Auffällig ist jedoch, dass die Substanz sicherlich eine gewisse stationäre Konzentration nicht überschreiten kann, da die Konzentrationsmaxima bei einer Penetrationszeit von 300 Minuten liegen und anschließend wieder abfallen. (Ausnahme Lösung III S.8)

Dieser Effekt könnte sich in vivo durch die Funktionsfähigkeit des Drainagesystems der Kapillaren verstärken, so dass dann mit weitaus geringeren Konzentrationen in den einzelnen Hautschichten gerechnet werden könnte.

Ein Zusatz von EDTA, sowie das Ansäuern der gesamten Lösung durch HCL, brachten keine wesentlichen weiteren Erkenntnisse.

Vielmehr muss die Beantwortung aufgeworfener Fragen weiteren Untersuchungen, so z.B. der Bestimmung der Folatkonzentration in den einzelnen Hautschichten, vorbehalten bleiben.

ABB. 1

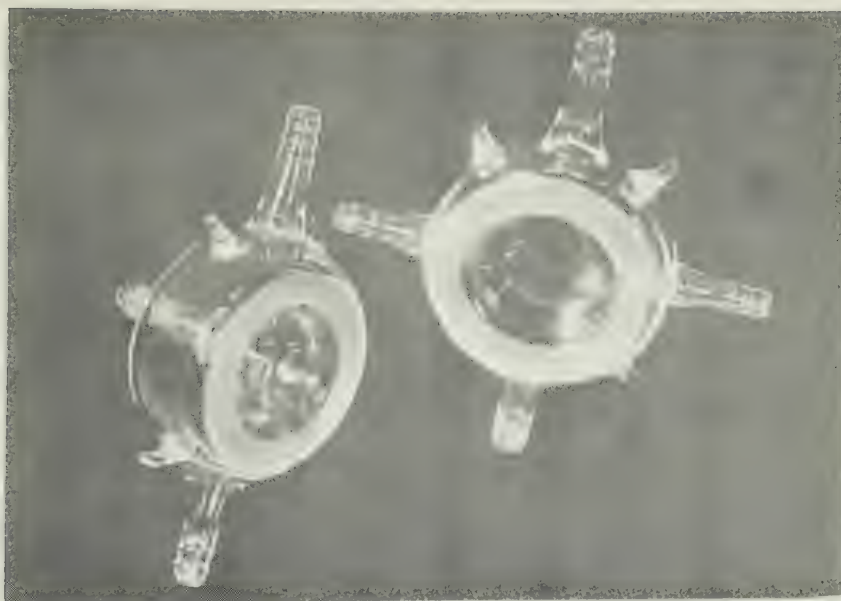


ABB. 2

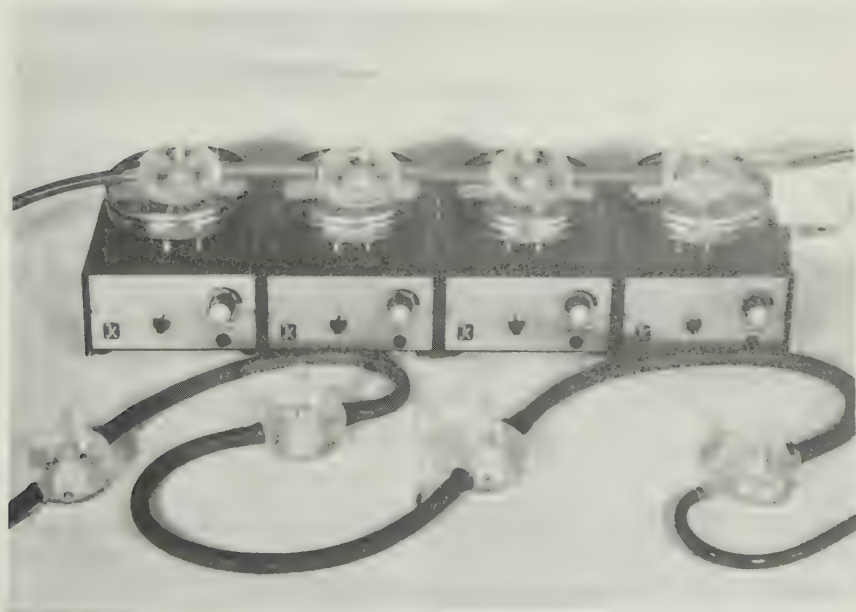


ABB. 3

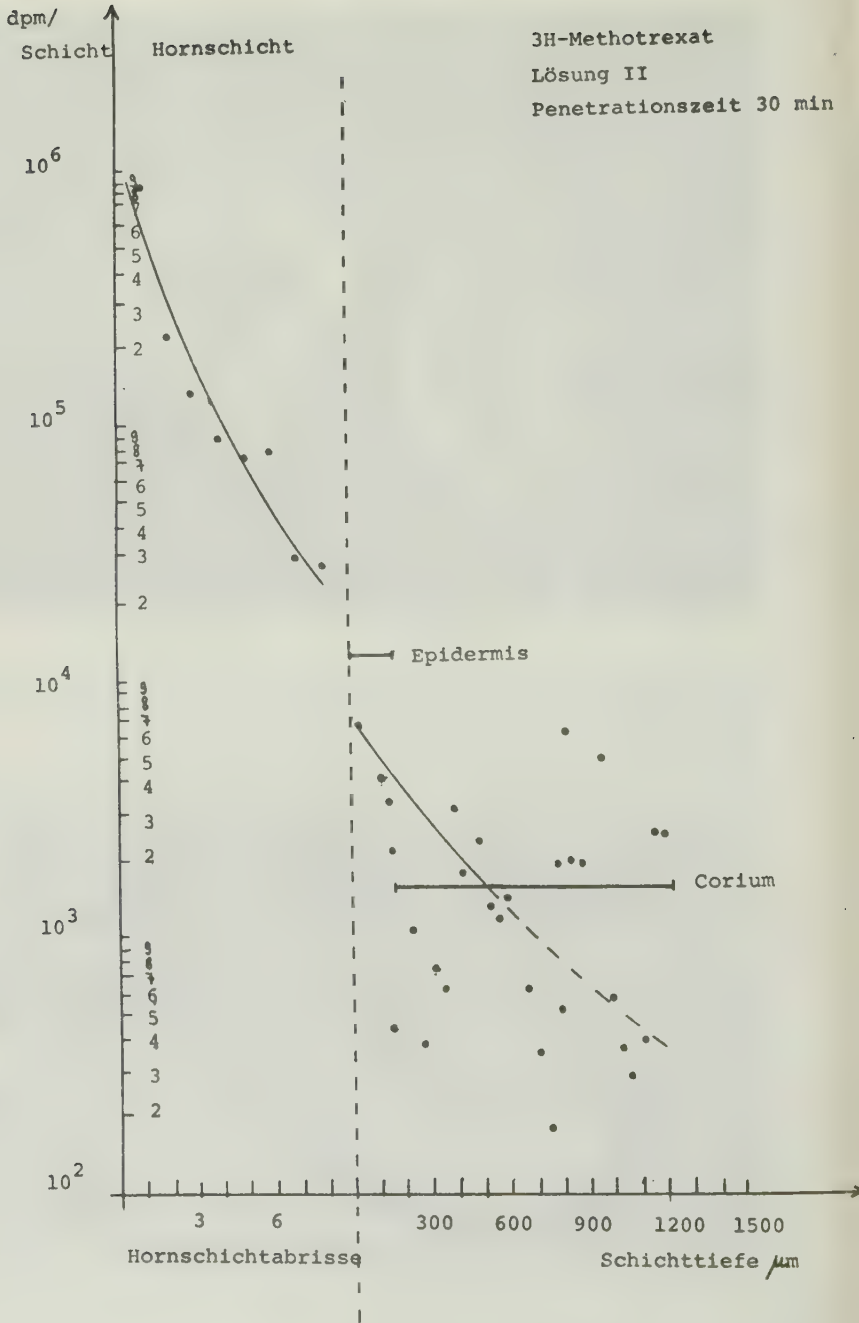


ABB. 4

Lösung I

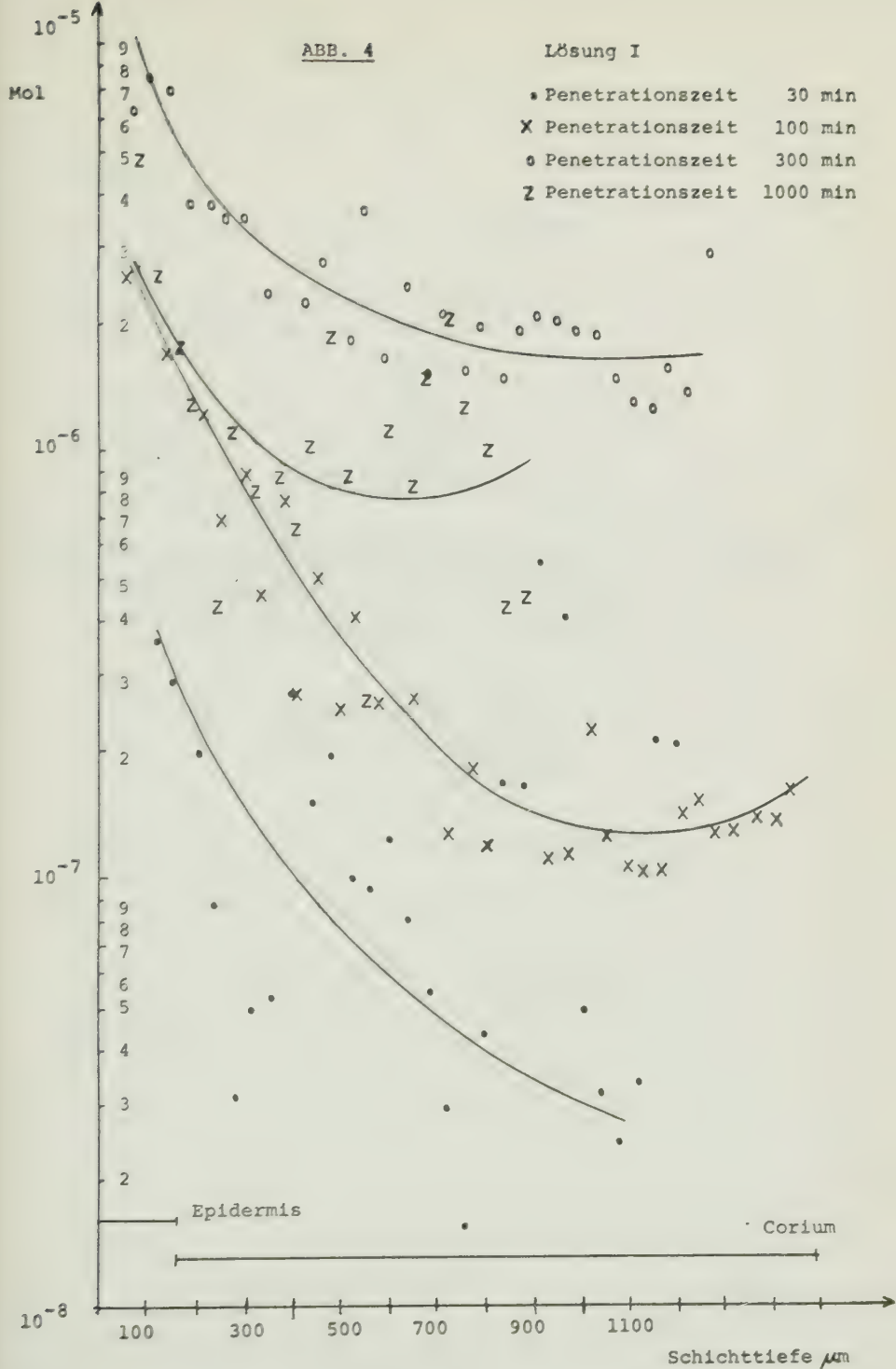
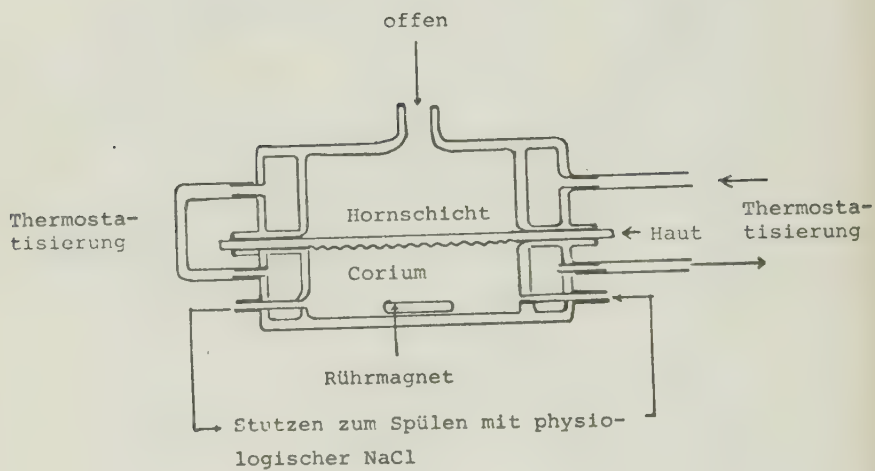


ABB. 5



LITERATUR

1. Weinstein, G. , Roenigk, H. , Maibach, H. und Cosmides, J.

Psoriasis-Liver-Methotrexate Interactions

36 Arch Dermatol/Vol 108, Juli 1973

2. Tobias, H. und Auerbach, R.

Hepatotoxicity of Long-Term Methotrexate Therapy
for Psoriasis

Arch Intern Med/Vol 132, Sept 1973

3. Weinstein, G. und Frost, P.

Methotrexate for psoriasis: A new therapeutic schedule

Arch Dermatol 103:33-38, 1971

4. Wolf, J.

Das Oberflächenrelief der menschlichen Haut

Z. mikr. anat. Forsch. 47 (1940) 351

5. Pinkus, H.

Examination of the Epidermis by the Strip Method
of Removing Horny Layers

J. invest. Derm. 16 (1951) 383

6. Stewart, W. , Wallace, S.M. , Runikis, J.O.

Absorbtion and Lokal Aktion of Methotrexate in
Human and Mouse Skin

Arch Derm/Vol 106, Sept 1972

7. Fry, L. and Mc Minn, R.M.H.

Topical Methotrexate in Psoriasis

Arch Derm Vol 96, Nov 1967

8. Comaish, S. and Juhlin, L.

Site of Aktion of Methotrexate in Psoriasis

Arch Derm-Vol 100 July 1969

9. Wallace, S.M.

Topical Methotrexate: Percutaneous Penetration
and Clinical Efficacy

Dissertation Abstr Intern. B 34, No 2, 743/1973

10. Grignani, F. und Martelli, M.F.

Folate-Dependent Enzymes in Human Epidermis

Arch. Derm- Vol 96/ 1967

11. Raab, W. und Gmeiner, B.

In Vitro Evaluation of Methotrexate and Azathioprine
for Antipsoriatic Activity

Arch Derm. Res 253. 77-84 (1975)

12. Ottinger, M., Schaefer, H. und Zesch, A.

Einfluss von systemisch verabreichtem Prednisolon und
Methotrexat auf die LDH-Aktivität der menschlichen Epidermis
Arzneimittel-Forsch. 23, 1035-1037 (1973)

13. Halprin, K.M. and Okhawara, A.

Methotrexate Effects on the Enzymes of Carbohydrate Meta-
bolism in Psoriasis

Arch. Derm. (Chicago) 96 (1967) 565

Maximilian Ottinger

775 Konstanz 19

Ringstr. 37

LEBENS LAUF

Am 2.3.1949 wurde ich als Sohn des Lehrers Maximilian Ottinger und seiner Ehefrau Hermine in Konstanz am Bodensee geboren.

Vom Frühjahr 1956 bis Frühjahr 1960 besuchte ich die Grundschule in Konstanz, trat dann zum Schuljahresbeginn 1960/61 in das A.v.Humboldt-Gymnasium Konstanz über und erlangte dort am 15. Juni 1968 die Hochschulreife.

Am 15. Oktober 1968 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin. Im Frühjahr 1970 bestand ich die ärztliche Vorprüfung.

Im Oktober 1970 begannen meine Arbeiten als Doktorand im Forschungslabor der Hautklinik des Rudolf-Virchow-Krankenhauses, die ich im Frühjahr 1975 beendete.

Die Prüfungen des Medizinischen Staatsexamens begannen am 15.3.74 und endeten am 8. August desselben Jahres.

Am 15. Oktober 1975 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Berlin, den 15.12.75

Maximilian Ottinger

